

Rec'd 10/525 809 #2  
PCT/PTO 25 FEB 2005  
PCT/JP03/10681

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

25.08.03

REC'D 10 OCT 2003  
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 7月11日  
Date of Application:  
  
出願番号 特願2003-273685  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2003-273685]

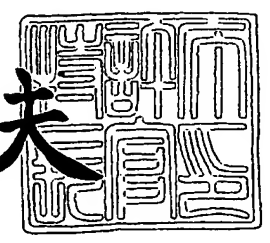
出願人 財団法人大阪産業振興機構  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月26日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 R8347  
【提出日】 平成15年 7月11日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C07C239/14  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府吹田市山田西 2-8 A9-310  
    【氏名】 佐々木 孝友  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府交野市私市 8-16-19  
    【氏名】 森 勇介  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府池田市石橋 1-21-18-232  
    【氏名】 吉村 政志  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府箕面市半町 2-15-41-C205  
    【氏名】 安達 宏昭  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府東大阪市南鴻池町 2-4-16  
    【氏名】 増原 宏  
【発明者】  
    【住所又は居所】 兵庫県神戸市北区道場町日下部 719-8  
    【氏名】 細川 陽一郎  
【特許出願人】  
    【識別番号】 801000061  
    【氏名又は名称】 財団法人大阪産業振興機構  
【代理人】  
    【識別番号】 110000040  
    【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ  
    【代表者】 池内 寛幸  
    【電話番号】 06-6135-6051  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2002-245700  
    【出願日】 平成14年 8月26日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 139757  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

結晶化対象の溶質が溶解している溶液に対し、パルスレーザーを照射することにより結晶核を生成させる結晶核の製造方法。

**【請求項 2】**

パルスレーザーをレンズで溶液中に集光し、その集光位置で単発若しくは複数発の局所的な爆発現象を生じさせ、これによって結晶核を生成する請求項 1 記載の製造方法。

**【請求項 3】**

パルスレーザーの光密度が、 $5 \times 10^5$  (watt) 以上である請求項 1 または 2 記載の製造方法。

**【請求項 4】**

パルスレーザーのレーザー強度が、 $60 \text{ nJ/pulse}$  以上である請求項 1 から 3 のいずれかに記載の製造方法。

**【請求項 5】**

パルスレーザーが、ピコ秒パルスレーザーおよびフェムト秒パルスレーザーの少なくとも一つである請求項 1 から 4 のいずれかに記載の製造方法。

**【請求項 6】**

パルスレーザーの照射回数が、単発から 1000 万発である請求項 1 から 5 のいずれかに記載の製造方法。

**【請求項 7】**

前記溶液が、過飽和溶液である請求項 1 から 6 のいずれかに記載の製造方法。

**【請求項 8】**

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法を実施するための結晶核製造装置であって、パルスレーザー照射手段を有する装置。

**【請求項 9】**

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法により溶液中に結晶核を生成させ、これを基に結晶を成長させる結晶の製造方法。

**【請求項 10】**

結晶化対象の溶質が、有機物である請求項 9 記載の製造方法。

**【請求項 11】**

結晶化対象の溶質が、タンパク質である請求項 9 記載の製造方法。

**【請求項 12】**

結晶化対象の溶質が溶解している溶液に対し、パルスレーザーを照射する工程と、前記レーザー照射により結晶核が生成するか否かを判定する工程および前記レーザー照射により溶質が変化しているか否かを判定する工程の少なくとも一方とを含む結晶化条件のスクリーニング方法。

**【請求項 13】**

パルスレーザーをレンズで溶液中に集光し、その集光位置で単発若しくは複数発の局所的な爆発現象を生じさせ、これによって結晶核を生成若しくは溶質の変性を誘起する請求項 12 記載のスクリーニング方法。

**【請求項 14】**

パルスレーザーの光密度が、 $5 \times 10^5$  (watt) 以上である請求項 12 または 13 記載のスクリーニング方法。

**【請求項 15】**

パルスレーザーのレーザー強度が、 $60 \text{ nJ/pulse}$  以上である請求項 12 から 14 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

**【請求項 16】**

パルスレーザーが、ナノ秒パルスレーザー、ピコ秒パルスレーザーおよびフェムト秒パルスレーザーからなる群から選択される少なくとも一つである請求項 12 から 15 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

**【請求項 17】**

パルスレーザーの照射回数が、単発から 1000 万発である請求項 12 から 16 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

**【請求項 18】**

前記溶液が、過飽和溶液である請求項 12 から 17 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

**【請求項 19】**

結晶化対象の溶質が、有機物である請求項 12 から 18 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

**【請求項 20】**

結晶化対象の溶質が、タンパク質である請求項 12 から 18 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

**【請求項 21】**

請求項 12 から 20 のいずれかに記載のスクリーニング方法を実施するためのスクリーニング装置であって、パルスレーザー照射手段を有する装置。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 結晶核の製造方法および結晶化条件スクリーニング方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、結晶核の製造方法および結晶化条件のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ポストゲノム研究の進展により、タンパク質の構造解析が急務になってきているが、そのためには、タンパク質を結晶化する必要がある。また、有機結晶は、次世代デバイス材料として有望視されており、その高品質結晶製造技術のニーズが高い。一般に、溶液から結晶を析出させるためには、溶媒蒸発や温度変化などにより過飽和度を大きくする必要がある。しかし、有機物やタンパク質等のように分子量が大きい物質は、過飽和度を極めて大きくしないと結晶化しない。また、このような極めて大きな過飽和度の溶液では、一度結晶化が起こると、結晶が急成長するため、得られる結晶の品質に問題があるおそれがある。また、このような高分子量物質の結晶化は、一般に困難であり、生産性が悪かった。通常、結晶化の条件は、実際に結晶化を試みて、試行錯誤の結果、決定されるが、これでは、タンパク質や有機物等のように、結晶化が必要不可欠な物質では、煩雑すぎて、実用的ではない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、高品質の結晶を簡単に効率よく製造できる技術を提供することを第1の目的とし、結晶化条件を簡単に決定できる技術を提供することを第2の目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

前記第1の目的を達成するために、本発明の結晶核の製造方法は、結晶化対象の溶質が溶解している溶液に対し、パルスレーザーを照射することにより結晶核を生成させる方法である。

【0005】

このように、パルスレーザーを照射すれば、低過飽和溶液であっても結晶核が生成するので、これを基に、結晶をゆっくり成長させることができ、その結果、高品質の結晶が簡単に効率良く製造できる。本発明の方法は、タンパク質の結晶化および有機物の結晶化に最適であるが、その他の物質の結晶化にも使用できる。

【0006】

また、前記第2の目的を達成するために、本発明の結晶化条件のスクリーニング方法は、結晶化対象の溶質が溶解している溶液に対し、パルスレーザーを照射する工程と、前記レーザー照射により結晶核が生成するか否かを判定する工程および前記レーザー照射により溶質が変化しているか否かを判定する工程の少なくとも一方を含む方法である。

【0007】

このように、パルスレーザーを照射して結晶核の生成を観察し、結晶核が生成すれば、その溶液等の条件は、結晶化に適していると判断できる。また、パルスレーザーを照射して溶質の状態を観察し、溶質が変化していれば、その溶液等の条件は結晶化に適していると判断できる。前記溶質の変化は、タンパク質の場合、例えば、立体構造の変化（変性）である。

【0008】

過飽和溶液にパルスレーザーを照射すれば、結晶核が生成するが、そのメカニズムは不明である。これについて、本発明者等は、以下のように推測している。すなわち、パルスレーザーの焦点では、高密度の光子が集中するために、一つの溶質分子もしくは溶媒分子に光子が数個衝突し、それらが光を吸収する現象（多光子吸収）が高い確率で起こる。そ

の結果として、パルスレーザーを集光した時、その焦点で急激な光吸収による爆発現象（レーザーアブレーション）が誘起される。結晶核生成は、これが振動となり起こると考えられる。そして、その後のメカニズムとしては、下記の3つの考えられる。

#### 【0009】

(1) パルスレーザーにより光熱変換が引き起こされ焦点付近の溶液が瞬間的に蒸発し、溶質の濃縮が起こった結果として結晶核が生成する。

(2) パルスレーザーが誘起するアブレーションにより衝撃波が発生し、それにより溶液が局所的に揺らされた結果として結晶核が生成する。

(3) レーザーの強度が強くなると溶液中で誘導散乱が引き起こされ、溶液中に濃度勾配が生成し、結晶核が生成する。

#### 【発明の効果】

#### 【0010】

このように、本発明によれば、結晶化が困難なタンパク質や有機物であって、容易に効率的に結晶核を生成でき、これをゆっくり成長させれば高品質の結晶が得られる。また、本発明によれば、結晶化条件をスクリーニングでき、結晶化条件を迅速に決定できる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0011】

つぎに、本発明をさらに詳しく説明する。

#### 【0012】

前述のように、本発明では、パルスレーザーをレンズで溶液中に集光し、その集光位置で単発若しくは複数発の局所的な爆発現象を生じさせ、これによって結晶核を生成することが好ましく、また前記爆発現象により、溶質を変化させることも好ましい。

#### 【0013】

本発明において、パルスレーザーの光密度（光子流量：photon flux）は、例えば、 $5 \times 10^5$  (watt) 以上であり、好ましくは  $2 \times 10^9$  (watt) 以上である。パルスレーザーの光密度の上限は、特に制限されないが、例えば、 $10^{18}$  (watt) 以下であり、好ましくは  $10^{15}$  (watt) 以下であり、より好ましくは  $10^{12}$  (watt) 以下である。

#### 【0014】

後述するように、レーザー光強度 (W) および時間幅 ( $\Delta t$ ) の積が、光密度 (I) であるから、レーザーの条件は、時間幅によって、例えば、以下のように設定することができる。なお、パルスレーザーは、例えば、ピコ秒パルスレーザーおよびフェムト秒パルスレーザーがあり、このなかで、フェムト秒レーザーが特に好ましい。

#### 【0015】

(ナノ秒パルスレーザー)

	パルス時間幅 (秒)	レーザー光強度 A (J/pulse)	レーザー光強度 B (J/pulse)
一般的範囲	$10^{-6} \sim 10^{-9}$	$0.5 \sim 0.5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^3 \sim 2$
好ましい範囲	$10^{-8} \sim 10^{-9}$	$0.5 \times 10^{-2} \sim 0.5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10 \sim 2$

レーザー光強度 A：光密度 (I) =  $5 \times 10^5$  (watt) 以上の場合

レーザー光強度 B：光密度 (I) =  $2 \times 10^9$  (watt) 以上の場合

(ピコ秒パルスレーザー)

	パルス時間幅 (秒)	レーザー光強度 A (J/pulse)	レーザー光強度 B (J/pulse)
一般的範囲	$10^{-9} \sim 10^{-12}$	$0.5 \times 10^{-3} \sim 0.5 \times 10^{-6}$	$2 \sim 2 \times 10^{-3}$
好ましい範囲	$10^{-11} \sim 10^{-12}$	$0.5 \times 10^{-5} \sim 0.5 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-3}$

レーザー光強度 A：光密度 (I) =  $5 \times 10^5$  (watt) 以上の場合

レーザー光強度 B：光密度 (I) =  $2 \times 10^9$  (watt) 以上の場合

(フェムト秒パルスレーザー)

	パルス時間幅 (秒)	レーザー光強度 A (J/pulse)	レーザー光強度 B (J/pulse)
--	---------------	------------------------	------------------------

一般的範囲	$10^{-12} \sim 10^{-15}$	$0.5 \times 10^{-6} \sim 0.5 \times 10^{-9}$	$2 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-6}$
好ましい範囲	$10^{-13} \sim 10^{-15}$	$0.5 \times 10^{-7} \sim 0.5 \times 10^{-9}$	$2 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-6}$
レーザー光強度A: 光密度 (I) = $5 \times 10^5$ (watt) 以上の場合			
レーザー光強度B: 光密度 (I) = $2 \times 10^9$ (watt) 以上の場合			

パルスレーザーは、単発で照射してもよいし、複数発繰り返して照射してもよい。パルスレーザーの照射回数は、特に制限されないが、例えば、1発(単発)から1000万発の範囲である。また、繰り返し複数発照射する場合のレーザー繰り返し周波数は、例えば、 $1/10000000\text{ Hz} \sim 1\text{ kHz}$ の範囲である。照射時間も特に制限されず、例えば、1秒から1時間の範囲である。

#### 【0016】

パルスレーザーの具体例としては、例えば、フェムト秒チタンサファイアレーザー、フェムト秒ファイバーレーザー、ナノ秒・ピコ秒Nd<sup>3+</sup>:YAGレーザー、ナノ秒・ピコ秒Nd<sup>3+</sup>:VO<sub>4</sub>レーザー、エキシマレーザーおよびアレクサンドライトレーザー等がある。

#### 【0017】

本発明において、結晶化対象の溶質が溶解している溶液は、過飽和溶液であることが好ましく、より好ましくは低過飽和溶液である。タンパク質溶液の濃度は、例えば、200～500%であり、好ましくは100～300%であり、より好ましくは50～200%である。有機物溶液の濃度は、例えば、20～50%であり、好ましくは10～30%であり、より好ましくは5～20%である。また、本発明の対象となるタンパク質としては、例えば、リゾチーム、グルコースイソメラーゼ、キシラーゼ、ミオグロビン、カタラーゼ、トリプシン、ヒトリゾチーム、フォトアクティブイエロープロテイン等がある。有機物としては、例えば、4-dimethylamino-N-methyl-4'-N-stilbazolium tosylate (DAST) 等がある。

#### 【0018】

つぎに、本発明の方法を実施するための装置の一例を図1に示す。図示のように、この装置は、フェムト秒レーザー照射手段1、機械シャッター2、半波長板3、偏光子4、集光レンズ5、恒温水槽8を有する。恒温水槽8の中には、水9が入っており、その中に、結晶化対象の溶質が溶解した溶液7が入った試料容器6が配置される。恒温水槽8では、温度を徐々に低下させることで、溶液7の溶解度を低下させて過飽和状態にする。この時、過度の過飽和にすると結晶成長が速くなるので、低度の過飽和にする。そして、レーザー照射手段1よりレーザー光10を照射すると、レーザー光10は、機械シャッター2、半波長板3、偏光子4および集光レンズ5を通過し、溶液7内で集光し、ここで急激な光吸収による爆発現象がおき、これが結晶核生成を誘引する。結晶を成長させる場合は、この結晶核を基に、時間をかけてゆっくりと成長させれば、高品質の単結晶が得られる。また、結晶化条件をスクリーニングする場合、溶液の濃度、溶質の構成比率、温度条件を少しずつ変えた溶液を複数準備し、それらにレーザー光を照射後、溶液を観察する。そして、結晶核の生成や溶質の変化が確認できた場合、その溶液は結晶化条件に適していると判断し、そうでない場合は、結晶化条件不適と判断する。本発明のスクリーニング方法は、結晶化条件決定の一次スクリーニングとして使用することが好ましい。

#### 【実施例1】

#### 【0019】

つぎに、本発明の実施例について比較例と併せて説明する。

#### 【0020】

#### (装置)

図1に示す装置を実施例1、2、比較例1および参考例に用いた。この装置は、高出力フェムト秒チタンサファイアレーザー10を焦点距離170 mmのレンズ5により集光し、恒温水槽8中の試料溶液7に照射する装置である。恒温水槽8は、温度を±0.05℃の精度で制御できる。レーザー10の波長は800nm、時間幅は120fsである。レーザー発振の繰

り返し周波数は1 kHzから1 Hzまで調整できる。試料溶液7に単発のレーザーパルス照射するときは、繰り返し周波数を20 Hzに調節し、そのパルス列から機械シャッター2を50 msだけ開くことにより単発パルスを抜き出す。レーザー光強度は、半波長3と偏光子4により調整できる。この装置では、試料溶液7に対して強度 $250 \mu\text{J/pulse}$  ( $2 \times 10^9 \text{ watt}$ ) のレーザーパルスを照射することができる。

#### 【0021】

DAST(4-dimethylamino-N-methyl-4'-N-stilbazolium tosylate)3.5gを、メタノール200mlおよび回転子と共に、容量200mlのテフロン(登録商標)容器6に入れ、初期温度 $27.0^\circ\text{C}$ の恒温水槽8内にて2時間で $55.0^\circ\text{C}$ まで上昇させ、スターラ攪拌しながら溶解させた。約5時間後にDASTが溶解しているのを確認して溶液7を3つに分け、育成溶液とした。この際、回転子を取り除いた。溶液準備16時間後に、 $55^\circ\text{C}$ で10時間加熱後、毎時間 $3^\circ\text{C}$ ずつ下げて $23^\circ\text{C}$ まで温度を降下させた。さらに、毎時間 $0.1^\circ\text{C}$ で下げ $21.4^\circ\text{C}$ まで温度を降下させた。この状態で、フェムト秒レーザーを光強度 $250 \mu\text{J/pulse}$  ( $2 \times 10^9 \text{ watt}$ )、繰り返し周波数1kHzで2分間照射した。その後、1時間は結晶析出のないことを確認し、その10時間後に肉眼で結晶が析出していることを確認した。前記温度を保持したまま、約6日観察を続けたところ、最初に発見した結晶は成長し、更に2、3個の結晶を確認した。再び強度 $250 \mu\text{J/pulse}$  ( $2 \times 10^9 \text{ watt}$ )、繰り返し周波数1kHzで1分間レーザーを照射し、その後3日間は結晶析出のないことを確認した。

#### 【実施例2】

##### 【0022】

結晶核生成対象として、鶏卵白リゾチームを使用した。その溶液は、蒸留水50mlに酢酸ナトリウム三水和物0.467gを加え、これに酢酸を加えてpH4.5に調整した後、塩化ナトリウム1.25gおよび鶏卵白リゾチーム1.25gを加えて調製した。室温に調整した前記試料溶液7を、100mlのテフロン容器6に入れ、恒温水槽8にて $40^\circ\text{C}$ で24時間保持し、完全に溶解させた。その後、 $25^\circ\text{C}$ まで5時間で冷却し、メンブランフィルタにて不純物を除去した。その溶液2mlとフロリナート3mlを、10本の直径18mmのネジ蓋付きガラス瓶6にそれぞれ注入した。これらのガラス瓶6を $25^\circ\text{C}$ に保持した恒温水槽8内に静置させ、溶液温度を $15^\circ\text{C}$ まで20時間で降下させた。この試料溶液(リゾチーム溶液)7の飽和点は $23.8^\circ\text{C}$ である。そして、結晶の析出がないことを確認して $14^\circ\text{C}$ まで24時間で降下させ、 $14^\circ\text{C}$ で24時間保持し、再度、結晶の析出がないことを確認した。そして、光強度 $250 \mu\text{J/pulse}$  ( $2 \times 10^9 \text{ watt}$ ) のフェムト秒パルスレーザーを溶液7内に1分間、順次照射して、変化を観察した。照射条件は、レーザーの繰り返し周波数を変化させ、50Hz、100Hzで、それぞれ前記ガラス瓶2本ずつ照射し、コントロールとして4本の前記ガラス瓶にはレーザーを照射しなかった。レーザー照射1日後に、50Hz、100Hzの溶液中に結晶が析出していることを肉眼で確認した。レーザーを照射していない溶液では結晶の析出は見られなかった。また、結晶の析出が見られなかった溶液に500Hz、1000Hzのレーザーをそれぞれ照射したところ、溶液内に、リゾチームが凝集(変性)しているのが観察され、この溶液は結晶化の可能性ありと判定した。

#### 【比較例1】

##### 【0023】

実施例2と同じ条件のタンパク質溶液を用いて、YAGレーザー(波長1064nm、5 ns)を照射して結晶核の生成を試みた。前記タンパク質溶液は、蒸留水50mlに酢酸ナトリウム三水和物0.467gを加え、これに酢酸を加えてpH4.5に調整した後、塩化ナトリウム1.25gおよび鶏卵白リゾチーム1.25gを加えて調製した。室温に調整した前記試料溶液7を、100mlのテフロン容器に入れ、恒温水槽にて $40^\circ\text{C}$ で24時間保持し、完全に溶解させた。その後、 $25^\circ\text{C}$ まで5時間で冷却し、メンブランフィルタにて不純物を除去した。その溶液2mlとフロリナート3mlを、10本の直径18mmのネジ蓋付きガラス瓶にそれぞれ注入した。これらのガラス瓶を $25^\circ\text{C}$ に保持した恒温水槽内に静置させ、溶液温度を $15^\circ\text{C}$ まで20時間で降下させた。この試料溶液(リゾチーム溶液)の飽和点は $23.8^\circ\text{C}$ である。そして、結晶の析出がないことを確認して $14^\circ\text{C}$ まで24時間で降下させ、 $14^\circ\text{C}$ で24時間保持し、再度、結晶の析出

がないことを確認した。そして、YAGレーザーを溶液内に1分間、順次照射して、変化を観察した。照射条件は、レーザーの繰り返し周波数を変化させ、10Hz、20Hz、50Hz、100Hz、500Hz、1000Hzをそれぞれ照射し、コントロールとして4本のガラス瓶にはレーザーを照射しなかった。レーザー強度は1.2mJ/pulseであった。レーザー照射1日後、結晶の析出は確認できず、さらに過飽和度を大きくするため16℃まで10時間で降下させ、12時間保持し、結晶の析出がないことを確認して、再度レーザーを照射した。照射条件は上記と同じである。この時も結晶の析出は確認できず、同様に、15℃、14℃でもレーザー照射したが、結局、結晶の析出および変性を確認できなかった。この例での光強度は、実施例で用いたフェムト秒パルスレーザーよりも10倍大きい、光密度(光子流量)は $2.5 \times 10^5$  (watt)であり、実施例の一万分の一であり、これが原因で結晶核が生成しなかったと推察できる。

#### 【0024】

##### (参考例)

図2に示す装置を用いてパルスレーザーの爆発現象により生じであろう衝撃波を調べた。この装置は、パルスレーザー照射装置を正立顕微鏡に組み込んだものである。図示のように、正立顕微鏡11は、観察対象物を置くステージ28と、コンデンサーレンズ29と対物レンズ(100倍、開口数1.25)26を備え、前記ステージ28の上には、マイクロチップ27が配置されている。また、正立顕微鏡11下部のコンデンサーレンズ29下には、光源ランプ13が配置され、この光を検出するCCDカメラ12が顕微鏡11上部に配置されている。また、正立顕微鏡11外部にパルスレーザー照射装置21が配置されており、レーザー22は、1/2波長板23および偏光子24を通して正立顕微鏡11内に照射され、ダイクロイックミラー25によって光路が直角に曲げられてステージ28上のマイクロチップ27内に照射されるようになっている。前記パルスレーザーとしては、チャープ増幅による高出力フェムト秒チタンサファイアレーザー(800 nm, 120 fs)を使用している。また、マイクロチップ27内には、ポリスチレン微粒子(直径1  $\mu$ m)の分散液が入っている。この装置において、レーザー22を照射すると、ステージ28上に配置されたマイクロチップ27内のポリスチレン微粒子分散液にレーザー22が集光する。そして、マイクロチップ27内の様子は、CCDカメラ12で観察する。

#### 【0025】

つぎに、この装置を使い、ポリスチレン微粒子に対する衝撃波の影響を調べた。すなわち、前述の条件により、ポリスチレン微粒子分散液内に単発でフェムト秒チタンサファイアレーザーを照射した。レーザーの集光点で発生すると予想される衝撃波は3次元的に拡散し、微粒子はレーザー集光点から遠ざかる方向へ押される。この衝撃波によるポリスチレン微粒子の動きをCCDカメラで観察し、レーザーの集光点から離れる距離を調べることで、衝撃波の大きさを見積もった。図3は、パルスレーザー照射による衝撃波がポリスチレン微粒子に与える力の関係を模式的に表したものである。同図において、 $f$ は微粒子が受ける衝撃波の力を示し、 $F_0$ は衝撃波により発生する力を示し、 $R_0$ は微粒子の初期位置を示し、 $R$ は衝撃波中心からの微粒子の位置を示し、 $r$ は微粒子の半径を示し、32はレーザー光を示し、33はポリスチレン微粒子を示し、34はレーザーの集光点を示し、37はポリスチレン微粒子分散液を示す。また、図4は、パルスレーザー照射と、その衝撃波による微粒子の移動距離の関係を示すグラフである。同図において、横軸は、時間を示し、縦軸は、衝撃波中心からの微粒子の位置( $R$ )を示し、 $R_0$ は微粒子の初期位置を示し、 $L$ は微粒子の移動距離を示し、黒丸はパルスレーザーの照射時間を示す。このグラフに示すように、パルスレーザーが照射されると、微粒子が瞬間的に焦点から遠ざかることが解る。衝撃波がインパルス応答で3次元的に等方的に伝搬して、微粒子が水の粘性抵抗により停止すると仮定した場合、以下の式が成立し、微粒子の初期位置( $R_0$ )と移動距離( $L$ )の関係から衝撃波により発生する力( $F_0$ )を見積もることができる。

#### 【0026】

【数1】

微粒子の受ける衝撃波の力:

$$f = F_0 \frac{\pi r^2}{4\pi R_0^2} \delta(t)$$

微粒子の運動方程式:

$$m \frac{d^2 R}{dt^2} = -6\pi\eta r \frac{dR}{dt} + f$$

微粒子の変位量:

$$L = R(t = \infty) - R_0$$

$$\Leftrightarrow L = \frac{F_0 \cdot r}{24\pi\eta} \cdot \frac{1}{R_0^2}$$

このようにして、数百にのぼる微粒子の動きを観測し、フェムト秒チタンサファイアレーザーの光強度と衝撃波により発生する力の関係を求めた。その結果を、図6のグラフに示す。このグラフにおいて、縦軸は衝撃波の力 ( $F_0$ ) を示し、横軸はレーザー光強度 ( $I_0$ ) を示す。図示のように、この参考例では、60 nJ/pulse以上で衝撃波を確認できた。爆発現象の閾値は、多光子吸収の確率に依存するため、レーザーエネルギーの総量として定義されるレーザー強度ではなく、瞬間的に到達する光の密度 ( $I$ ) により関係づけられる。この参考例では、時間幅 ( $\Delta t$ ) 120 fs のパルスレーザーのレーザー強度 ( $W$ ) が60 nJ/pulseであったから、その光密度 ( $I$ ) は、以下のようになる。

【0027】

$$I = W / \Delta t = 5 \times 10^5 \text{ (J/s} \cdot \text{pulse} = \text{watt)}$$

したがって、この参考例では、時間幅 ( $\Delta t$ ) は、 $\Delta t < W / 5 \times 10^5$  となる。この式とレーザー照射装置の能力とを考慮すると、ナノ秒以下の時間幅を持つパルスレーザーが好ましく、より好ましくはピコ秒以下、最適にはフェムト秒以下である。なお、この参考例によって、本発明は限定的に解釈されない。また、この参考例では、レーザー集光点で爆発現象が起きて衝撃波が発生すると仮定しているが、本発明は、これに限定されない。

【実施例3】

【0028】

本実施例は鶏卵白リゾチーム (14 kDa) を結晶化した実施例である。タンパク質溶液の条件は、25 mg/ml のリゾチーム、2.5% の塩化ナトリウム、0.1 M の酢酸ナトリウム、pH 4.5 であり、室温で調製した。この溶液を、メンブランフィルタにて

不純物を除去した。

#### 【0029】

結晶化は、図6に示すレーザー照射装置および結晶化プレートを用い、バッチ法にて行った。図示のように、このレーザー照射装置では、フェムト秒レーザー照射装置101から照射されたレーザーが、ミラー102、波長板103、偏光子104およびシャッター105を通過して対物レンズ(10倍)108で集光され、結晶化プレート109の結晶育成容器部107に照射されるようになっている。前記結晶化プレート109は、蒸気拡散法を利用したものであり、タンパク質溶液を入れる結晶育成容器部107と、これと連通しているサーバー溶液部106とを有する。前記サーバー溶液は、タンパク質溶液において、タンパク質を除いた残りの成分と同じ成分が溶解している溶液であり、これによってタンパク質溶液の蒸発が促進される。同図において、110はシーリングテープであり、111は透明ガラスである。そして、前記結晶育成容器部107は、接眼レンズ112で肉眼で観察できるようになっており、またCCD113カメラおよびモニター114によっても観察可能となっている。

#### 【0030】

レーザーの照射は、温度・湿度管理したクリーンルーム内(温度 $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $65\%\pm 5\%$ )で行った。レーザーの波長は $780\text{nm}$ 、時間幅は $200\text{fs}$ 、レーザー発振の繰り返し周波数は $1\text{kHz}$ である。レーザー光強度は、波長板と偏光子により調節した。レーザー光の照射回数は、シャッターの開閉時間を変化させることにより調整した。

#### 【0031】

タンパク質溶液 $10\mu\text{l}$ を、結晶化プレート110のそれぞれの結晶育成容器部107に入れ、室温にて溶液中にレーザーを集光照射した。レーザーのパルス強度は $1.95\text{nJ}/\text{パルス}$ であった。シャッターの開閉時間により、8パルス( $1/125\text{秒}$ )、62パルス( $1/16\text{秒}$ )、24000パルス(24秒)、照射なし(0秒)とし、パルス数を変化させた。

#### 【0032】

レーザー照射後は $18^{\circ}\text{C}$ に設定した恒温槽内に静置して、その後の結晶成長を観察した。レーザー照射2日後の写真を図8に示す。結晶の析出数が、レーザー照射回数とともに増加した。また、照射していないサンプルにおいて、小さな結晶が非常に多く析出した。これは、高過飽和溶液のために、結晶核が溶液中の至る所で自然発生したためであり、一度に大量の核発生につながった。これは、通常の結晶育成においても、よく観られることであり、結晶の高品質化、大型化の障壁となっている。一方、レーザーを照射したサンプルにおいては、室温の低過飽和溶液内で結晶核が生成し、その核が種結晶となり、成長した。そのため、パルス数が増加すると、結晶核の生成量が増加するため、結果として、結晶析出が増加している。

#### 【実施例4】

#### 【0033】

本実施例は、リボヌクレアーゼH( $17\text{kDa}$ )の結晶化の実施例である。タンパク質溶液は、 $5\text{mg}/\text{ml}$ のリボヌクレアーゼHを、 $0.05\text{M}$ のトリス塩酸緩衝液( $\text{pH}9.0$ )に、室温で溶解することで調製した。その後、メンブランフィルタにて不純物を除去した。また、サーバー液(外液)として、 $0.2\text{M}$ のトリス塩酸、 $\text{pH}9.0$ を作成した。レーザー照射による結晶化は、図6に示すレーザー照射装置および結晶化プレートを用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法にて行った。

#### 【0034】

すなわち、タンパク質溶液 $10\mu\text{l}$ を結晶育成容器部107に入れ、サーバー溶液部106に $100\mu\text{l}$ の外液を分注した。そして、室温にてタンパク質溶液中にレーザーを集光照射した。レーザーの照射は、温度・湿度管理したクリーンルーム内(温度 $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $65\%\pm 5\%$ )で行った。レーザーの波長は $780\text{nm}$ 、時間幅は $200\text{fs}$ 、レーザー発振の繰り返し周波数は $1\text{kHz}$ である。レーザー光強度は、波

長板と偏光子により調節した。レーザー光の照射回数は、シャッターの開閉時間を変化させることにより調整した。レーザーのパルス強度は $1.95 \text{ nJ/パルス}$ であった。シャッターの開閉時間により、8パルス（1/125秒）、62パルス（1/16秒）、4000パルス（4秒）、8000パルス（8秒）、照射なし（0秒）とし、パルス数を変化させた。

#### 【0035】

レーザー照射後は $14^\circ\text{C}$ に設定した恒温槽内に静置して、その後の結晶成長を観察した。レーザー照射1日後の写真を図9に示す。照射していないサンプルにおいては、結晶の析出が2週間以上経っても見られなかった。しかしながら、レーザーの照射条件により析出状態に違いが見られた。8パルスでは、結晶核が生成しなかったのに対して、62パルスと4000パルスを照射した溶液からは、結晶の析出が観測できた。また、8000パルスを照射した溶液内には、変性したりボヌクレアーゼHが見られた。

#### 【実施例5】

##### 【0036】

本実施例は、グルコースイソメラーゼ（ $173 \text{ kDa}$ ）の結晶化の実施例である。タンパク質溶液は、 $20 \text{ mg/ml}$ のグルコースイソメラーゼを、 $0.2 \text{ M}$ の硫酸アンモニウム溶液（ $\text{pH } 7.0$ ）に室温で溶解して調製した。その後、メンブランフィルタにて不純物を除去した。また、サーバー液（外液）として、 $0.2 \text{ M}$ の硫酸アンモニウム、 $15\%$ のポリエチレングリコール（PEG）6000を溶解した溶液（ $\text{pH } 7.0$ ）を調製した。レーザー照射による結晶化は、図6に示すレーザー照射装置および結晶化プレートを用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法にて行った。

##### 【0037】

すなわち、タンパク質溶液 $10 \mu\text{l}$ を結晶育成容器部107に入れ、サーバー溶液部106に $100 \mu\text{l}$ の外液を分注した。その後、サーバー溶液部106から $5 \mu\text{l}$ をピペットにて吸い上げ、結晶育成容器部107に注入し、タンパク質溶液とサーバー溶液を十分混ぜた。そして、室温にてタンパク質溶液中にレーザーを集光照射した。レーザーの照射は、温度・湿度管理したクリーンルーム内（温度 $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $65\% \pm 5\%$ ）で行った。レーザーの波長は $780 \text{ nm}$ 、時間幅は $200 \text{ fs}$ 、レーザー発振の繰り返し周波数は $1 \text{ kHz}$ である。レーザー光強度は、波長板と偏光子により調節した。レーザー光の照射回数は、シャッターの開閉時間を変化させることにより調整した。レーザーのパルス強度は $1.95 \text{ nJ/パルス}$ であった。シャッターの開閉時間により、8パルス（1/125秒）、4000パルス（4秒）、照射なし（0秒）とし、パルス数を変化させた。

##### 【0038】

レーザー照射後は $18^\circ\text{C}$ に設定した恒温槽内に静置して、その後の結晶成長を観察した。レーザー照射1日後の写真を図10に示す。レーザーを照射した溶液からは結晶の析出が観察できたが、照射していないサンプルにおいては、結晶の析出が1ヶ月以上経っても見られなかった。本実施例では、分子量が約20万の巨大タンパク質であるグルコースイソメラーゼを結晶化できた。このことにより、レーザー照射を利用する本発明の方法は、このような巨大タンパク質の結晶化にも有効だといえる。

#### 【実施例6】

##### 【0039】

本実施例は、トリパノソーマ由来プロスタグランジン $\text{F}_2\alpha$ 合成酵素（ $31 \text{ kDa}$ ）の結晶化の実施例である。タンパク質溶液は、 $20 \text{ mg/ml}$ の前記合成酵素を、 $0.005 \text{ M}$ のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸（ $\text{NADP}^+$ ）と共に、 $0.04 \text{ M}$ のトリス塩酸緩衝液（ $\text{pH } 8.0$ ）に室温で十分溶解させたて、調製した。その後、メンブランフィルタにて不純物を除去した。また、サーバー溶液（外液）として、 $0.01 \text{ M}$ のヘプス水酸化ナトリウム緩衝液（ $\text{HEPES-NaOH}$ ）、 $2\%$ のポリエチレングリコール（PEG）400、 $1.2 \text{ M}$ の硫酸アンモニウムの溶液（ $\text{pH } 7.5$ ）を調製した。

##### 【0040】

レーザー照射による結晶化は、図7に示すレーザー照射装置および結晶化容器を用い、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて行った。図示のように、このレーザー照射装置では、フェムト秒レーザー照射装置101から照射されたレーザーが、ミラー102、波長板103、偏光子104およびシャッター105を通過して対物レンズ(10倍)108で集光され、結晶化容器118の結晶溶液117に照射されるようになっている。そして、前記結晶溶液117は、接眼レンズ112で肉眼で観察できるようになっており、またCCD113カメラおよびモニター114によっても観察可能となっている。同図において、116は外液であり、115はガラス板であり、119はグリースである。

#### 【0041】

図示のように、タンパク質溶液 $2\mu\text{l}$ と外液 $2\mu\text{l}$ を混合した結晶化溶液の液滴をガラス板115上に形成した。結晶化容器118に外液116を $500\mu\text{l}$ 入れ、前記結晶化溶液の液滴117を吊り下げるようにしてガラスで蓋をした。このとき、グリース119を用いて密封させた。外液116が落下しないように注意しながら、結晶化容器118を逆さにし、結晶化溶液の液滴117中にレーザーを集光照射した。レーザーの照射は、温度・湿度管理したクリーンルーム内(温度 $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $65\%\pm 5\%$ )で行った。レーザーの波長は $780\text{nm}$ 、時間幅は $200\text{fs}$ 、レーザー発振の繰り返し周波数は $1\text{kHz}$ である。レーザー光強度は、波長板と偏光子により調節した。レーザー光の照射回数は、シャッターの開閉時間を変化させることにより調整した。レーザーのパルス強度は $1.95\text{nJ}/\text{パルス}$ であった。シャッターの開閉により62パルス( $1/16\text{秒}$ )を照射した。対象実験として、レーザー照射なしサンプルを育成した。

#### 【0042】

レーザー照射後は、 $20^{\circ}\text{C}$ に設定した恒温槽内に静置して、その後の結晶成長を観察した。レーザー照射7日後の写真を図11に示す。レーザーを照射した溶液からは結晶の析出が観察できたが、照射していないサンプルにおいては、結晶の析出が3ヶ月以上経っても見られなかった。本実施例では、レーザー照射により短期間で結晶が生じた。

#### 【実施例7】

#### 【0043】

本実施例は、アデノシンデアミナーゼ(ADA)ネイティブの結晶化の実施例である。タンパク質溶液は、 $20\text{mg}/\text{ml}$ のADAネイティブ、を $0.0025\text{M}$ のヘプス緩衝液( $\text{pH}7.5$ )に室温で溶解することにより調製した。その後、メンブランフィルタにて不純物を除去した。また、サーバー溶液(外液)として、1)  $0.2\text{M}$ のクエン酸ナトリウム、 $0.1\text{M}$ のカコジル酸ナトリウムおよび $30\%$ イソプロパノールの溶液( $\text{pH}6.5$ )と2)  $0.2\text{M}$ の酢酸アンモニウム、 $0.1\text{M}$ のクエン酸ナトリウムおよび $30\%$ のポリエチレングリコール(PEG)4000の溶液( $\text{pH}5.6$ )を調製した。

#### 【0044】

レーザー照射による結晶化は、図6に示すレーザー照射用および結晶化プレートを使用し、シッティングドロップ蒸気拡散法にて行った。タンパク質溶液 $2\mu\text{l}$ を結晶育成容器部107に入れ、サーバー溶液部106に $100\mu\text{l}$ の外液1)と2)をそれぞれ分注した。その後、サーバー溶液部106から $2\mu\text{l}$ をピペットにて吸い上げ、結晶育成容器部107に注入した。タンパク質溶液と外液が十分に混ざった後、室温にてタンパク質溶液中にレーザーを集光照射した。レーザーのパルス強度は $1.95\text{nJ}/\text{パルス}$ であった。シャッターの開閉により、 $1000$ パルス( $1\text{秒}$ )を照射した。対象実験として、照射なしサンプルを育成した。

#### 【0045】

レーザー照射後は $20^{\circ}\text{C}$ に設定した恒温槽内に静置して、その後の結晶成長を観察した。レーザー照射7日後の写真を図12に示す。レーザーを照射した溶液からは結晶の析出が観察できたが、照射していないサンプルにおいては、結晶の析出が1ヶ月以上経っても見られなかった。本タンパク質に関して、これまでに結晶が得られたことはなく、本実施例において、初めて結晶化が実現できた。

#### 【産業上の利用可能性】

## 【0046】

本発明は、タンパク質や樹脂等の高分子の結晶化に有用である。したがって、本発明によれば、例えば、タンパク質の立体構造解析を、従来よりも効率良く実施できるようになる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0047】

【図1】本発明の一実施例に使用したレーザー照射装置の構成図である。

【図2】図2は、レーザー照射による衝撃波の大きさを測定する装置の一例を示す構成図である。

【図3】図3は、パルスレーザーの衝撃波と粒子の動きとの関係の一例を示す模式図である。

【図4】前記装置で測定した衝撃波による粒子の移動距離とレーザー集光点との関係を示すグラフである。

【図5】図5は、前記装置で測定した衝撃波の強度とレーザー強度との関係を示すグラフである。

【図6】本発明のその他の実施例に使用したレーザー照射装置の構成図である。

【図7】本発明のさらにその他の実施例に使用したレーザー照射装置の構成図である。

【図8】本発明の一実施例で生じたタンパク質結晶の写真である。

【図9】本発明のその他の実施例で生じたタンパク質結晶の写真である。

【図10】本発明のさらにその他の実施例で生じたタンパク質結晶の写真である。

【図11】本発明のさらにその他の実施例で生じたタンパク質結晶の写真である。

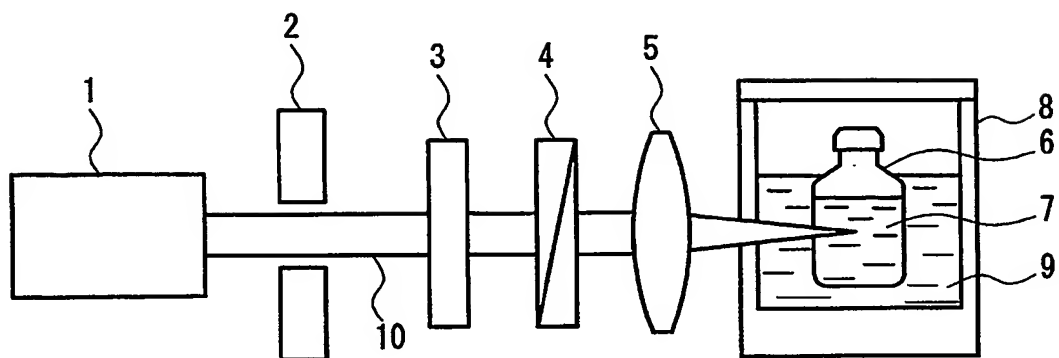
【図12】本発明のさらにその他の実施例で生じたタンパク質結晶の写真である。

## 【符号の説明】

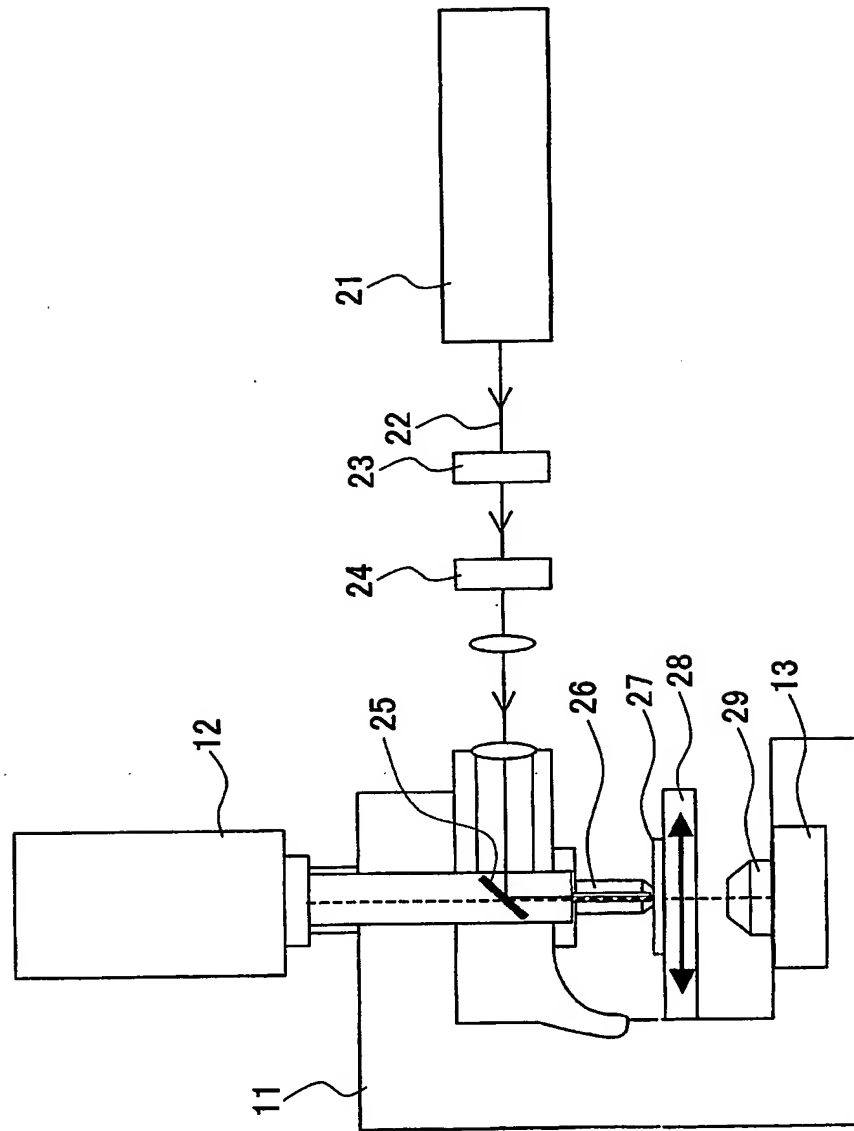
## 【0048】

- 1 レーザー照射手段
- 2 機械シャッター
- 3 半波長板
- 4 偏光子
- 5 集光レンズ
- 6 試料容器
- 7 溶液
- 8 恒温水槽
- 9 水

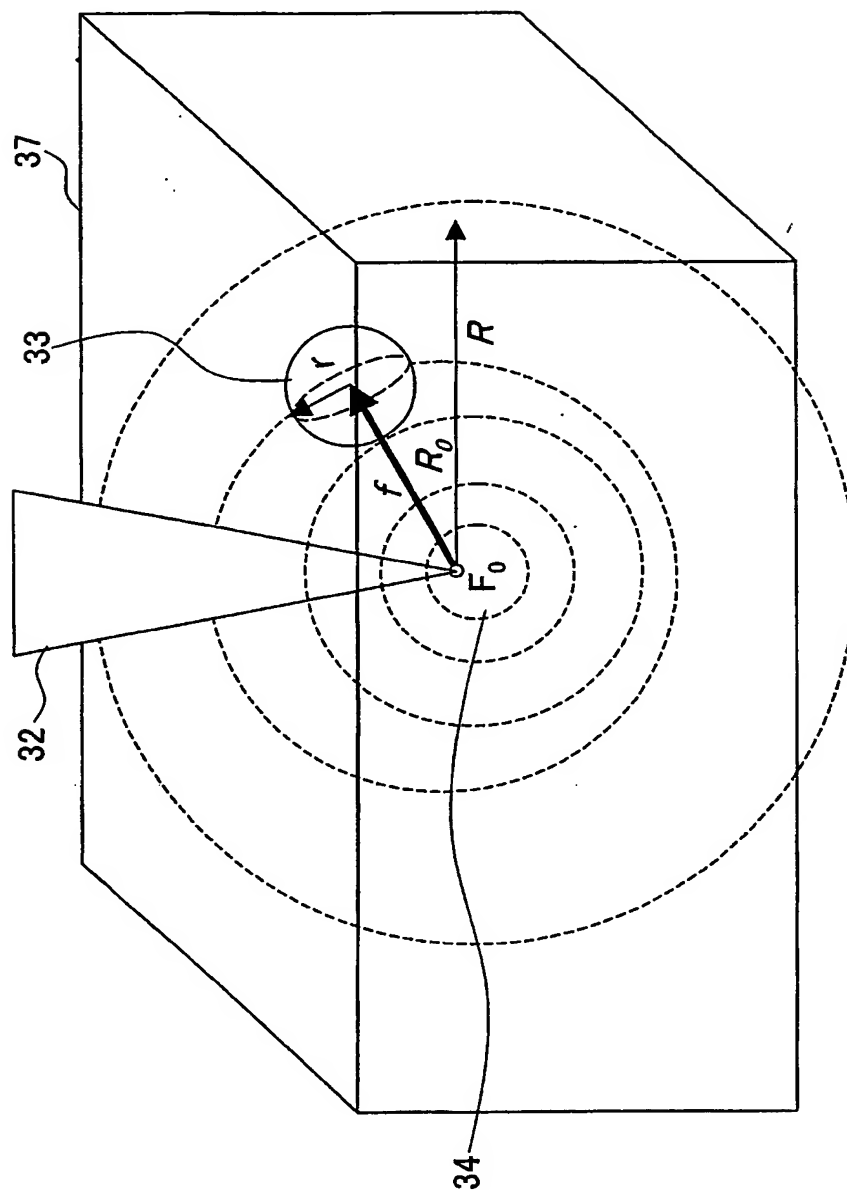
【書類名】 図面  
【図 1】



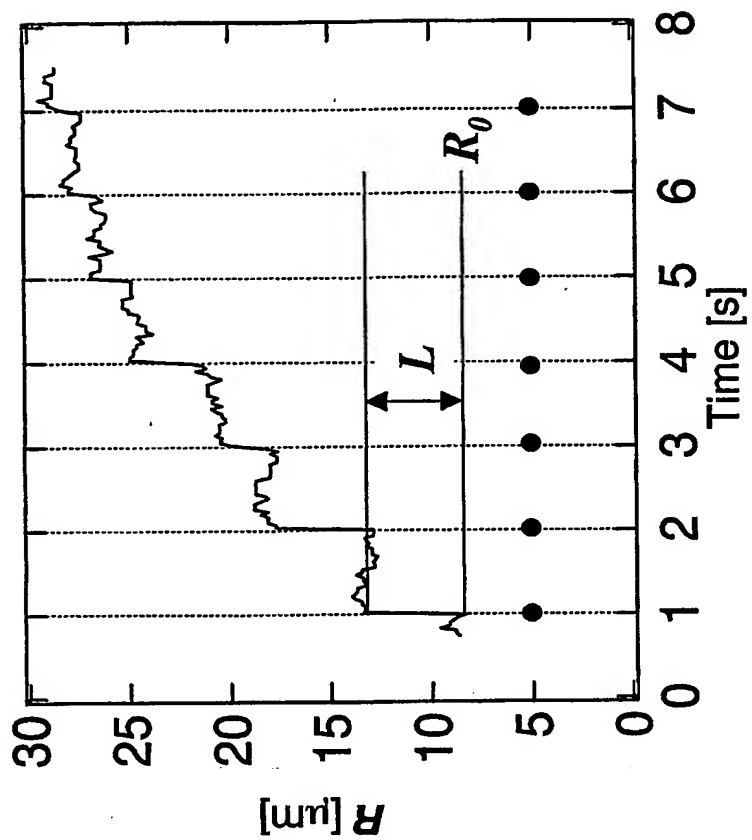
【図 2】



【図 3】

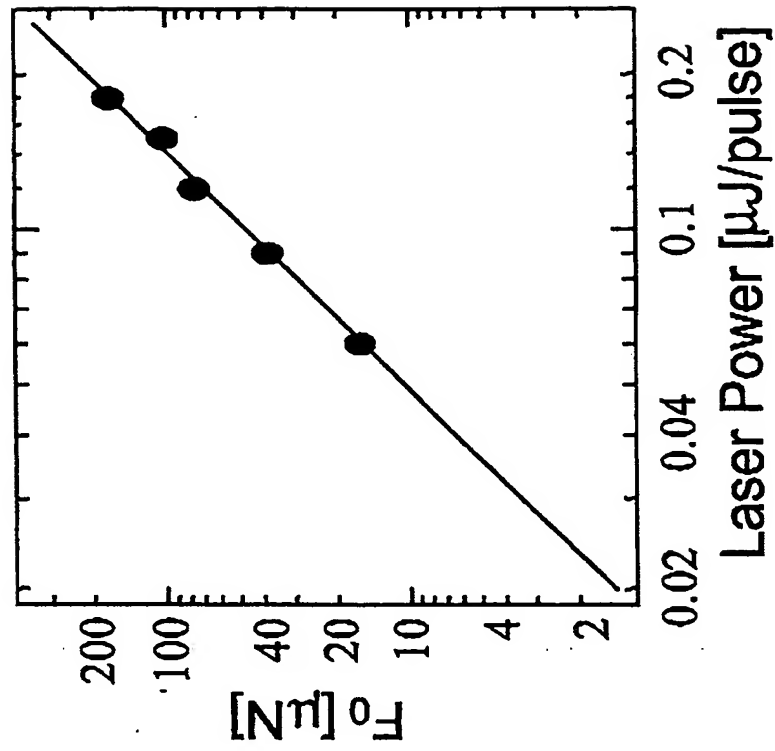


【図 4】

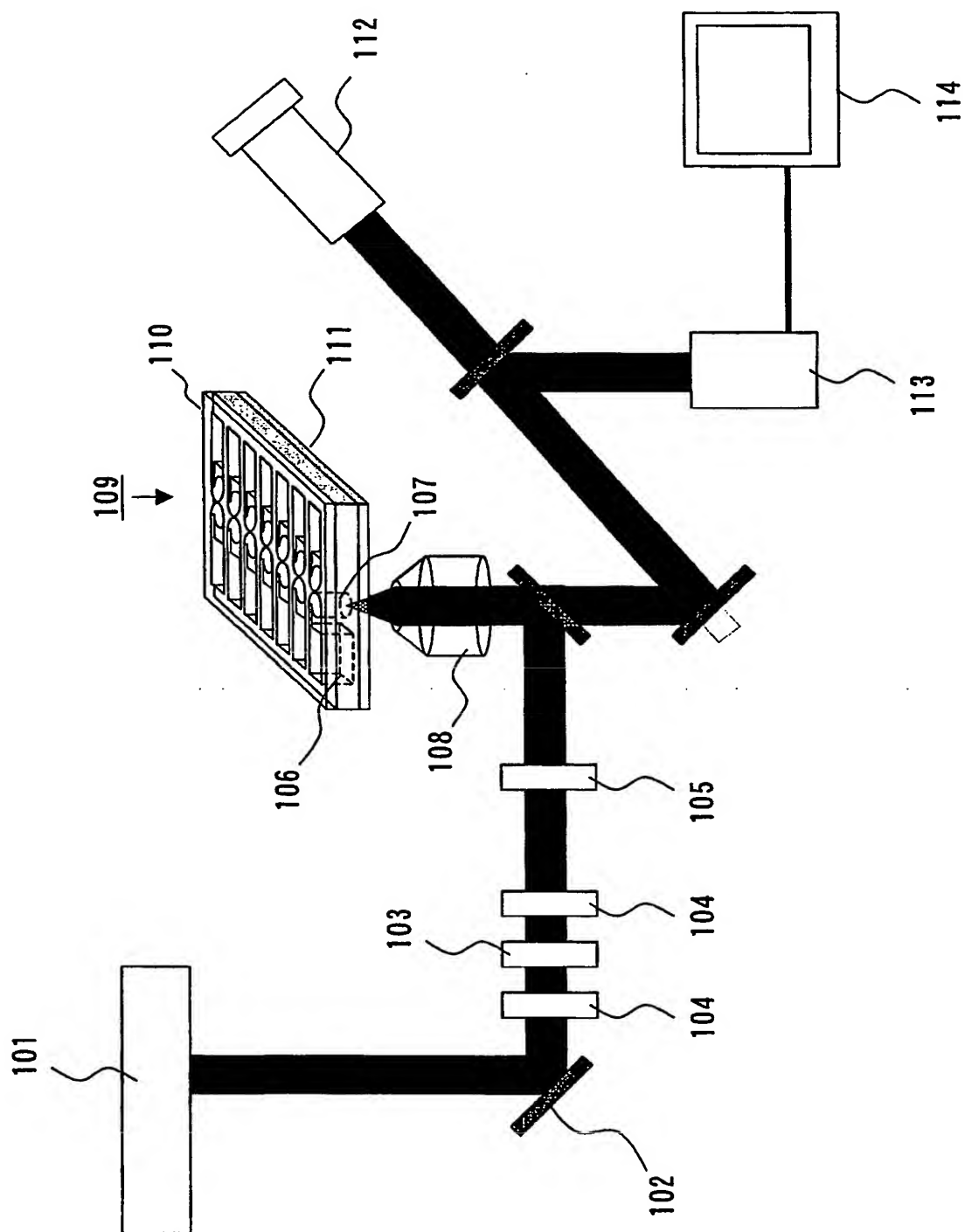


【図5】

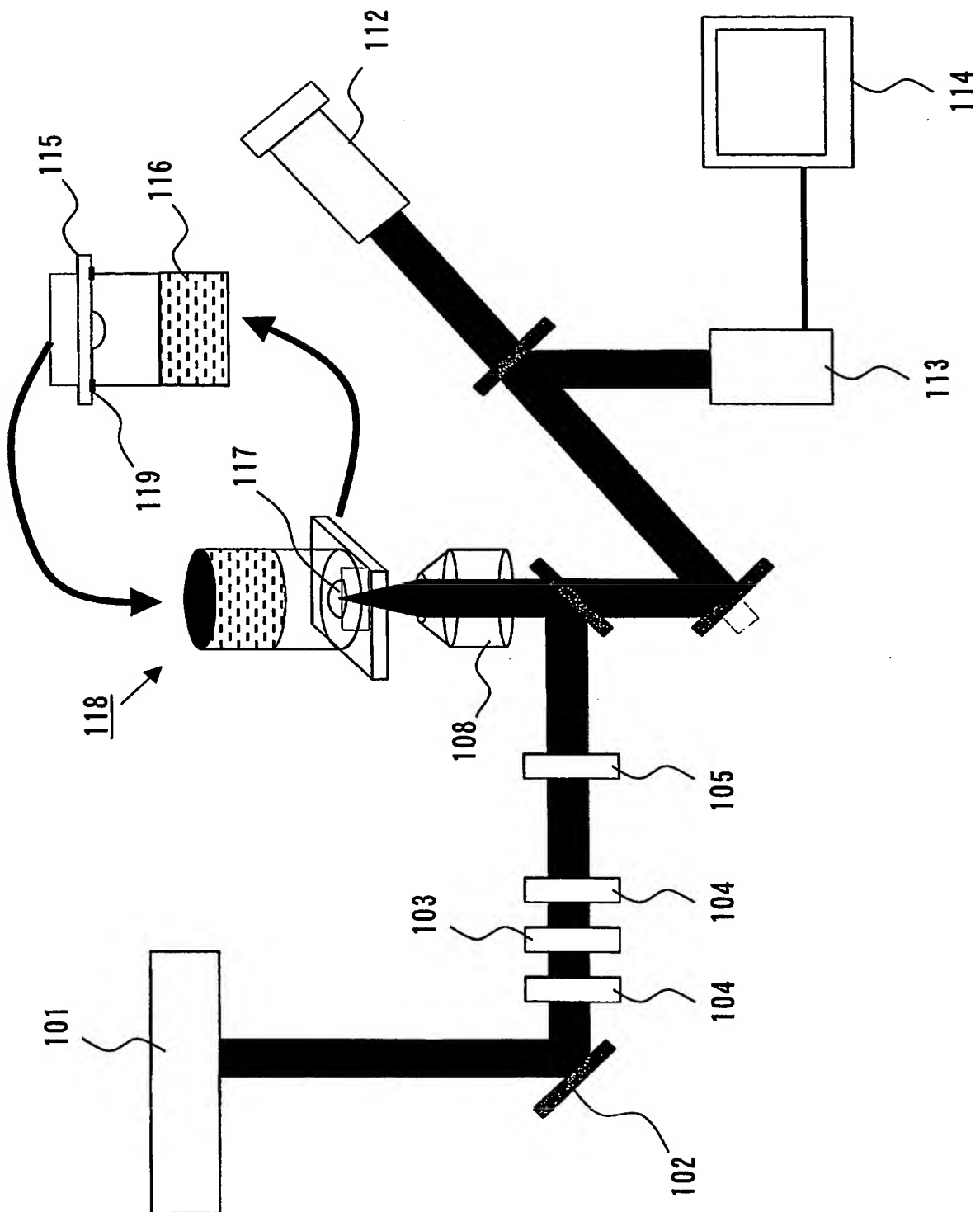
図4 衝撃波の強度( $F_0$ )とレーザー強度( $I$ )の関係



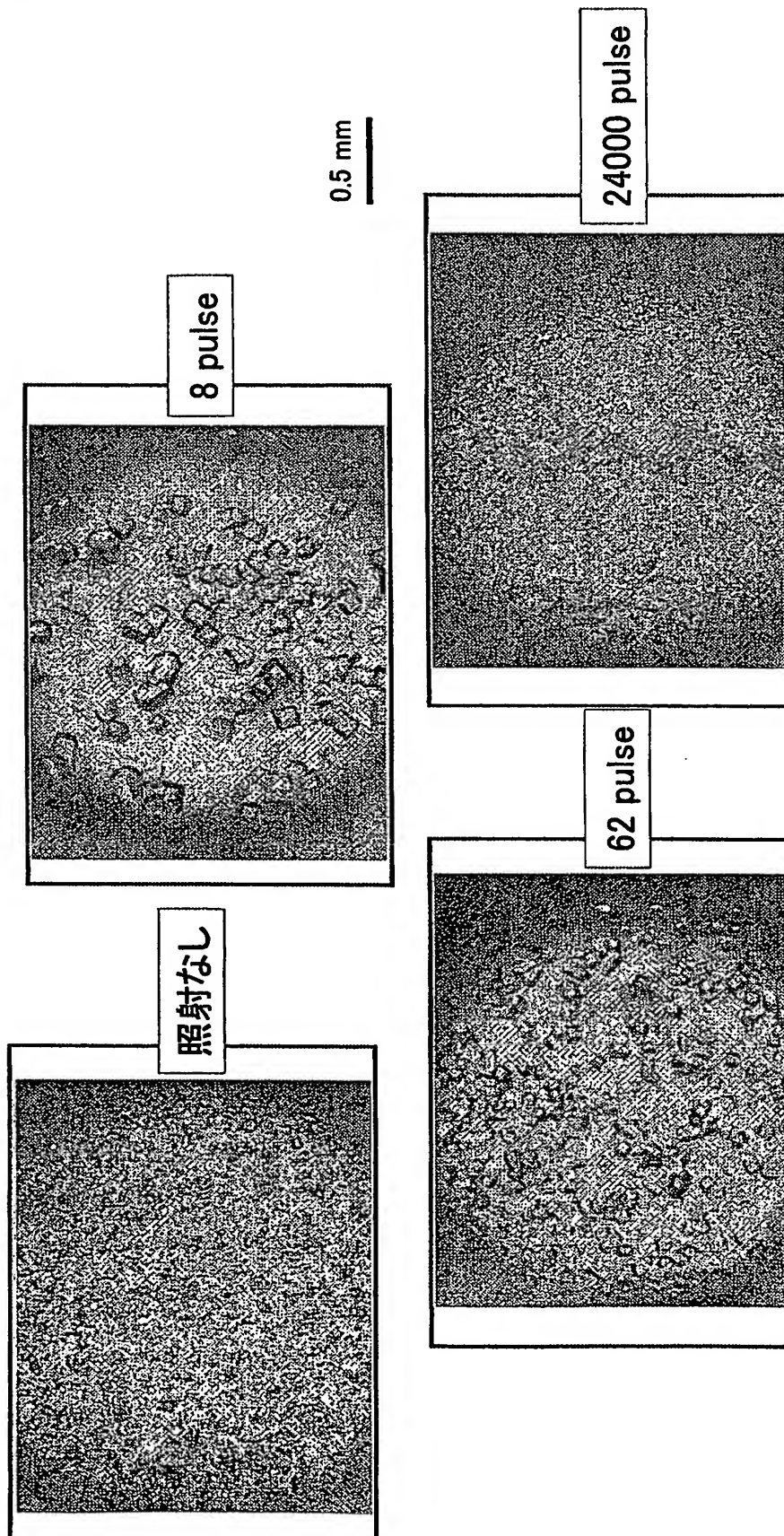
【図 6】



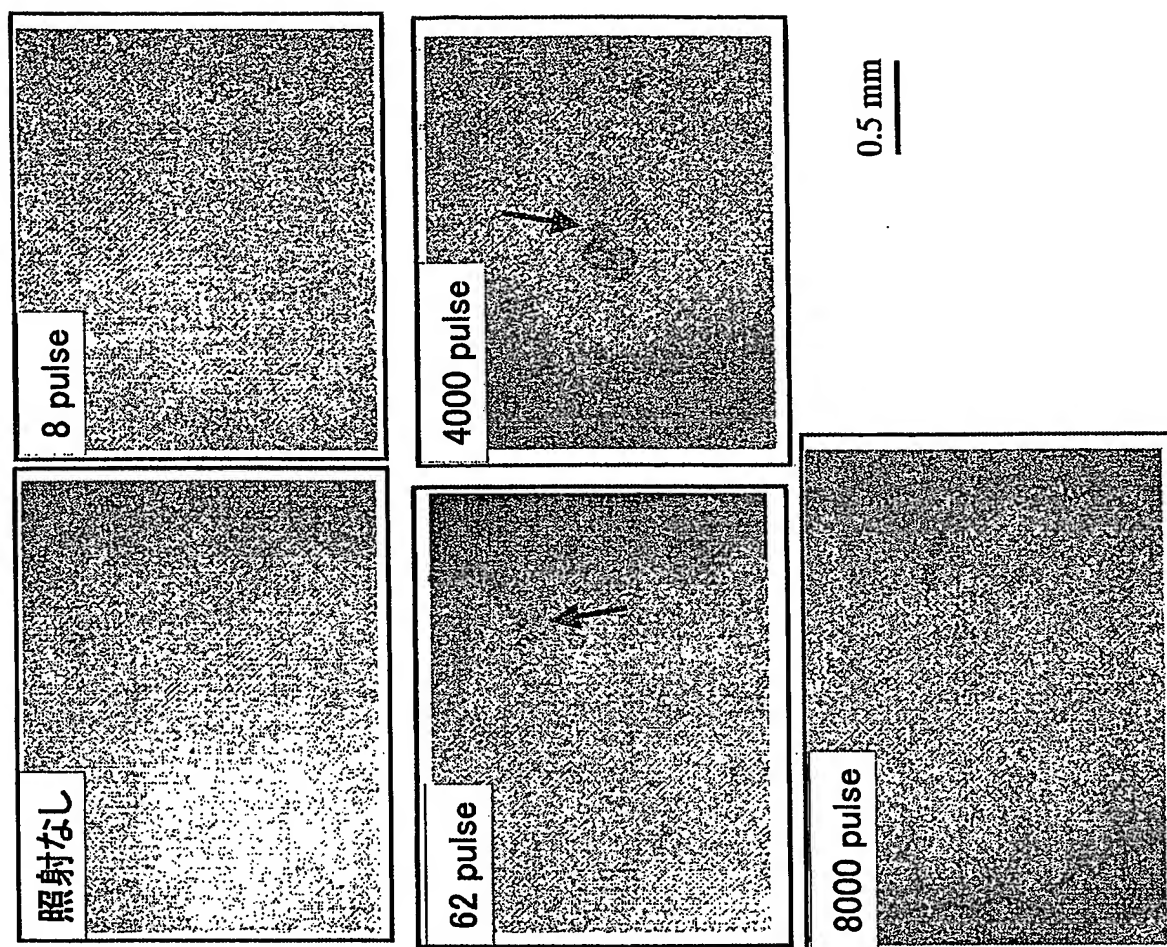
【図 7】



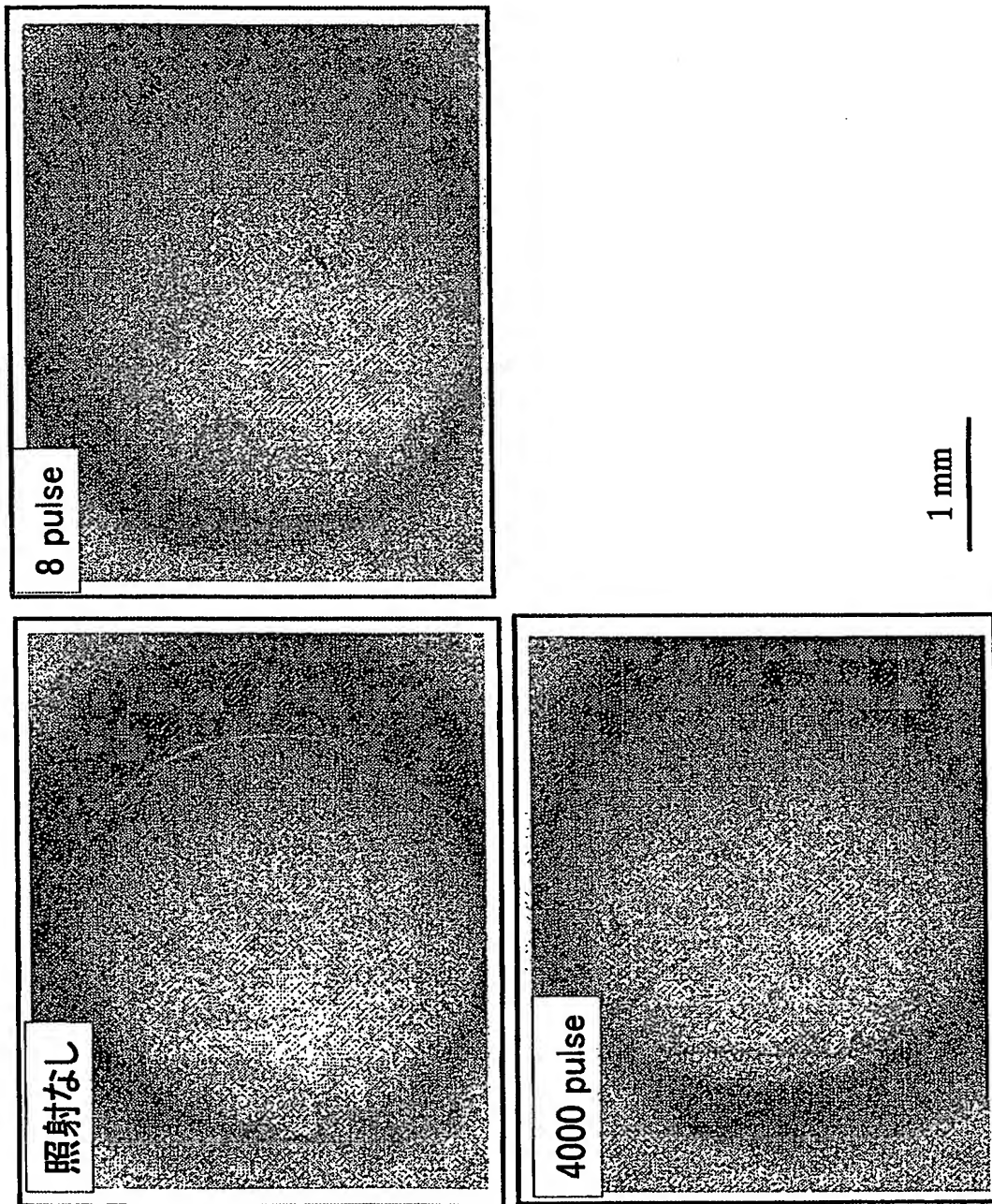
【図 8】



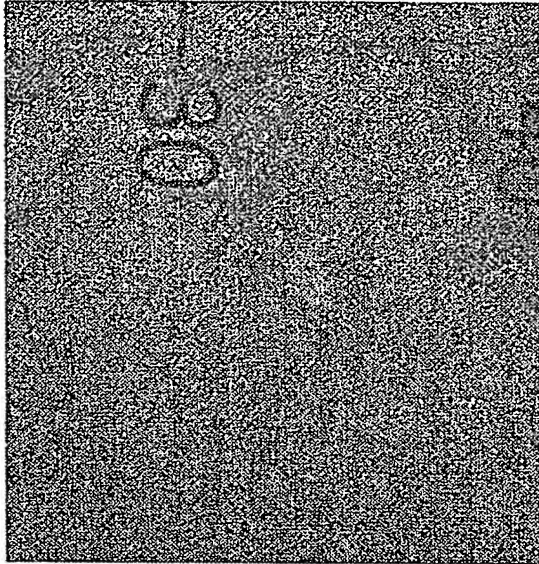
【図 9】



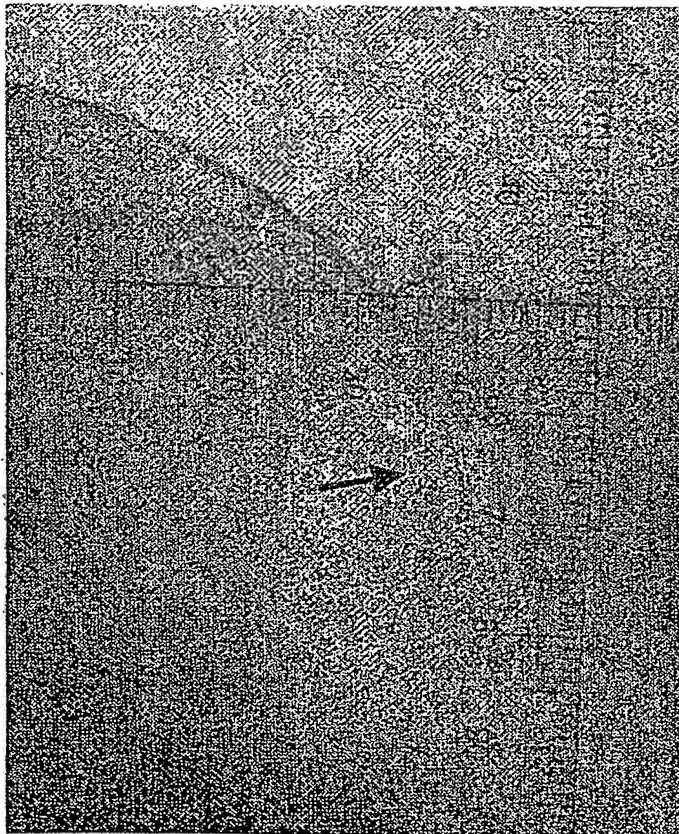
【図 10】



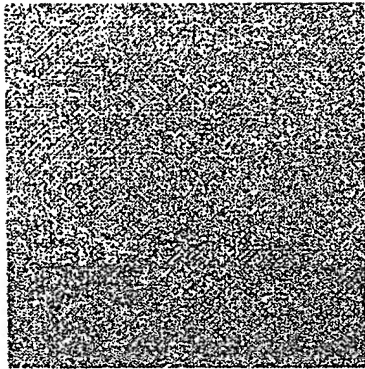
【図 11】



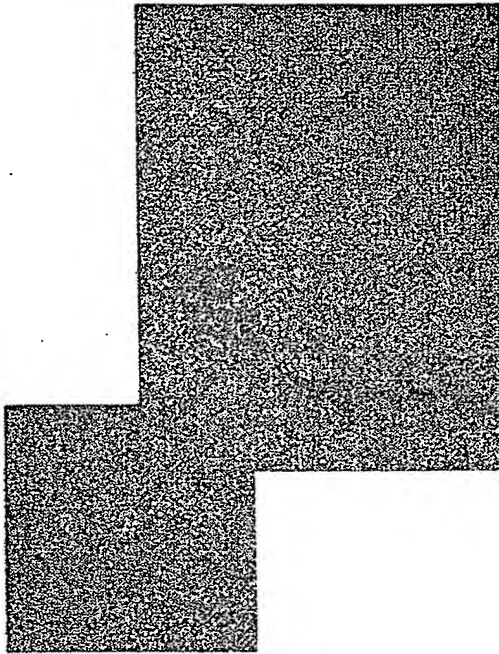
拡大



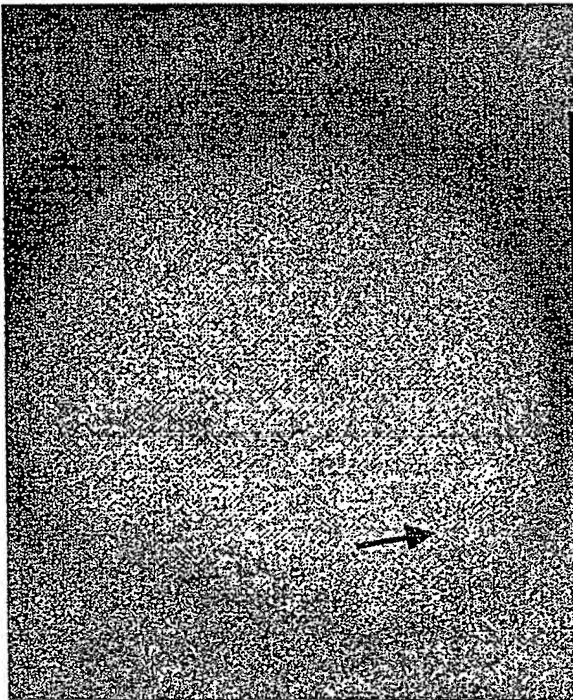
【図 12】



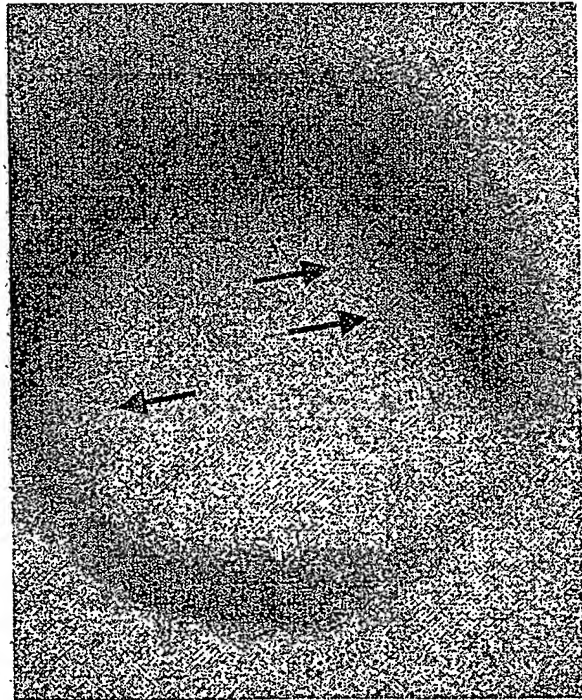
拡大



拡大



外液①



外液②

## 【書類名】 要約書

## 【要約】

【課題】 タンパク質や有機物の結晶を、高品質で効率良く簡単に製造する。

【解決手段】 タンパク質や有機物の溶液を調製し、これをゆっくりと冷却することによって低度の過飽和にする。この過飽和溶液に、フェムト秒レーザー10を照射する。レーザーの焦点では、局所的な爆発現象が起きて結晶核が生成する。この結晶核を基に、時間をかけて結晶を成長させれば、高品質の結晶が得られる。フェムト秒レーザーとしては、波長800nm、時間幅120fs、周波数1kHz、出力400mWのチタンサファイアレーザーが使用できる。

【選択図】 図1

特願 2003-273685

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[801000061]

1. 変更年月日

2001年 9月13日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区本町橋2番5号 マイドームおおさか内

氏 名

財団法人大阪産業振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**